

Notice Utilisateur

Trousse combinatoire
HISTO SPOT® On-Call Typing

Trousse de test pour le typage des allèles HLA par méthode de génétique moléculaire

10 combi-tests pour les loci HLA-A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQ, DPB1

CE 0123 IVD

Lire attentivement les instructions figurant dans le manuel d'utilisation du ou des système(s) et sur les étiquetages, et/ou dans la notice d'utilisation du réactif.

REF **726070 : HISTO SPOT® On-Call Typing** (10 x 7 tests)

Version : 3/2014
Edition : 2014-01

Table des matières

Distribué en Belgique, en France et au Luxembourg par :
médiane diagnostics Z.A. de la Chaîne 78370 PLAISIR **+33 1.30.07.50.60** info@mediane-diag.fr

1. DESCRIPTION DU PRODUIT

Le système HISTO SPOT® SSO est un test de diagnostic *in vitro* pour le typage tissulaire des allèles HLA, par méthode de génétique moléculaire. Les résultats de typage ont une résolution basse à moyenne. Le système est composé des trousses de typage HISTO SPOT®, de la trousse de réactifs communs HISTO SPOT® *Reagent Kit*, du processeur MR.SPOT® et du logiciel d'interprétation HISTO MATCH.

Les trousses de test HISTO SPOT® contiennent tous les composants nécessaires à la réaction PCR ainsi que les cupules réactionnelles avec des sondes d'oligonucléotides spécifiques de séquence pour la détection des produits PCR. La trousse HISTO SPOT® *Reagent Kit* contient tous les réactifs nécessaires à l'hybridation et à la détection. Elle peut être utilisée en association avec toutes les trousses de typage HISTO SPOT®. L'instrument MR.SPOT® est spécialement conçu pour être utilisé avec les trousses de test HISTO SPOT®, et traite entre 1 et 96 échantillons par cycle. Il automatise l'analyse depuis l'hybridation jusqu'à la détection et la prise d'images qui serviront à l'interprétation des résultats. Le logiciel HISTO MATCH est nécessaire à la lecture des images et l'interprétation des résultats.

La trousse combinatoire HISTO SPOT® On-Call Typing (*destinée à l'astreinte*) contient l'association de tous les loci à typer en vue d'une transplantation d'organe. La trousse est conçue pour faciliter autant que possible le flux de travail, en particulier en situation d'urgence. Les amorces d'amplification sont prêtes à l'emploi car déjà distribuées et séchées dans des barrettes PCR, et les cupules réactionnelles sont fournies pré-combinés sur un support spécial. Pour l'interprétation de cette association de tests le logiciel HISTO MATCH dispose d'une option de gestion intégrée.

2. PRINCIPE DU TEST

Le test est divisé en quatre étapes de base :

- Isolement de l'ADN
- Amplification par PCR
- Hybridation et Détection
- Interprétation des données

L'isolement de l'ADN est réalisé sur l'échantillon clinique, par une méthode d'isolement d'ADN définie au laboratoire ou avec une trousse commerciale. L'ADN est ensuite amplifié par une série de réactions PCR chacune spécifique d'un locus HLA ; barrettes PCR multi-test et prêt à l'emploi, tampon PCR avec Taq incorporée et solution de $MgCl_2$ sont fournis dans la trousse. La spécificité de l'amplification est obtenue par un ensemble d'amorces biotinylées, conçues pour amplifier spécifiquement le locus HLA ciblé. Après amplification par PCR, la barrette PCR contenant les différents amplicons marqués à la biotine est transférée sur le bloc échantillon du processeur. Le processeur MR.SPOT® ajoute le tampon d'hybridation à chaque puits et transfère chaque mélange après dénaturation dans la cupule correspondante contenant au fond des sondes SSO, immobilisées à l'aide d'une biopuce (SSO : oligonucléotides spécifiques d'une séquence). Ces sondes sont soit de simples sondes d'oligonucléotides, soit une

association d'au moins 2 sondes individuelles, immobilisées dans la même zone (sonde mosaïque) et servant à l'identification des polymorphismes situés en position « -cis ».

Ces amplicons, marqués à la biotine, se fixent aux sondes SSO spécifiques, celles qui contiennent une séquence cible complémentaire. Grace au marquage les amplicons fixés peuvent ensuite être détectés par une simple réaction colorimétrique. Pour éviter des fixations non spécifiques dans les cupules réactionnelles, la première tâche du processeur MR.SPOT® est de traiter chaque puits au préalable avec un tampon de blocage.

Après une étape de lavage drastique, pour éliminer tout amplicon non fixé, un conjugué (de la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline) est ajouté aux cupules où il est fixé sur le marquage (biotine) des amplicons présents suite à l'hybridation avec sa sonde SSO complémentaire. Après plusieurs autres lavages, le substrat BCIP/NBT est ajouté et produit une coloration bleu-violet grâce à l'activité de la phosphatase alcaline présente. Les points colorés générés au fond des cupules réactionnelles sont photographiés par le processeur MR.SPOT® et l'image est transmise au logiciel HISTO MATCH installé sur le PC servant à l'interprétation. Le programme d'analyse d'image du logiciel HISTO MATCH détermine l'intensité de chaque point (spot) présent sur la biopuce et la compare à l'intensité de son bruit de fond. À partir de ces données, les réactions positives et négatives sont déterminées en comparant à un seuil (biopuces pré-calibrées). Le programme de correspondance allélique du logiciel HISTO MATCH calcule à l'aide de chaque schéma d'hybridation observé le typage HLA de l'échantillon.

3. MATÉRIEL

3.1 Réactifs fournis avec la trousse HISTO SPOT® On-Call Typing

Les réactifs d'une trousse sont en quantité suffisante pour réaliser 10 typages multi-locus. Chaque trousse de tests (combi-tests) contient les éléments suivants :

Combistrip	**Cupules réactionnelles** pour le typage des loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQ, -DPB1 plus Ctrl. nég. associées sur un support spécial, contenant des sondes d'oligonucléotides spécifiques de séquence	10 combi-tests
PCR Primers	**Barrettes PCR** contenant selon le puits des amorces séchées pour l'amplification spécifique des loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQ, -DPB1 plus Ctrl. nég . (amorces HLA-A, -B et –DRB1)	10 barrettes
PCR Caps	**Bouchons PCR** (barrettes de 8x)	10 pièces
PCR Buffer	**Tampon PCR**, prêt à l'emploi, contenant des dNTP, de la Taq polymérase, du tampon de réaction et de l'azide de sodium à 0,05 %	1100 µL
MgCl2	**Chlorure de magnésium**, 6 mM, prêt à l'emploi, contient 0,001 % de ProClin® 300	600 µL

Chaque trousse combinatoire est livrée avec un **CD** comportant les fichiers relatifs aux sondes présentes sur les différentes biopuces qui doivent être enregistrés dans la base de données du logiciel d'interprétation HISTO MATCH s'il s'agit d'un nouveau lot de trousse pour le laboratoire

N.B.: pour obtenir des détails, consulter le Manuel utilisateur du logiciel HISTO MATCH.

A ce sujet il convient de différencier les notions Trousse & n° de Lot de la trousse, Vrac de sondes, puis Lots des vrac utilisés dans une trousse combinatoire.

- **Trousse :** par ex. **HISTO SPOT® A**, définit le locus analysé (**Lot** de la trousse).
- **Vrac :** par ex. **A084**, **A085**, définit la spécificité des sondes dudit vrac et leurs positions sur les biopuces contenues dans les cupules réactionnelles. Un même vrac (**Lot** de sondes) peut être utilisé pour plusieurs productions de trousses.
- **Lot de vrac:** par ex. A0**85-1**, A0**85-2**, A0**85-3**, définit comment une sonde donnée réagit par rapport aux sondes de contrôle (valeurs seuil) et correspond de ce fait à sa calibration. Chaque **Lot** de vrac sert à la fabrication de cupules réactionnelles et définit leur dates de fabrication et de péremption.

3.2 Réactifs et équipements nécessaires mais non fournis

- Processeur MR.SPOT® avec le logiciel HISTO MATCH, RÉF 726100
- Trousse de réactifs communs HISTO SPOT® Reagent Kit, RÉF 726098
- Embouts de pipettes pour l'instrument MR.SPOT®,
  1000 µL RÉF 726099 et 200 µL RÉF 726097
- Réactifs pour l'isolation des ADN (éviter le relargage au sel [salting out])
- Thermocycleur
- Eau désionisée
- Pipettes à volume variable (gamme 0,5 – 1 000 µL) et embouts jetables

4. CONSERVATION ET STABILITÉ

Tous les réactifs et composants des trousses doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de chaque réactif. Elle est valable pour les réactifs non entamés. La date de péremption indiquée sur l'étiquette externe (trousse) correspond au réactif contenu dans la trousse ayant la validité la plus courte.

Les réactifs ouverts seront à utiliser dans les 3 mois. La dilution du conjugué doit être préparée *extemporairement* à chaque série de test.

5. PROTOCÔLE

5.1 Précautions et recommandations

Les techniques de génétique moléculaire sont des méthodes particulièrement sensibles qui doivent être réalisées par du personnel bien formé, ayant l'expérience des techniques de génétique moléculaire et des tests d'histocompatibilité. Les résultats de

ces tests ne doivent pas être utilisés comme seul déterminant pour prendre des décisions cliniques.

Les directives de transplantation ainsi que les normes EFI doivent être respectées, de manière à réduire le risque de typages erronés. Ceci est particulièrement important dans le cas de résultats discordants observés entre les méthodes de sérologie et de génétique moléculaire.

Des précautions doivent être prises pour éviter la contamination et donc les fausses réactions :

- Porter des gants pour manipuler (sans poudre si possible).
- Utiliser de nouveaux embouts à chaque étape de pipetage (avec un filtre intégré).
- Utiliser des zones de travail séparées pour les tâches avant l'amplification (isolement de l'ADN et préparation des réactions) et après l'amplification (hybridation et détection). De préférence, utiliser deux pièces différentes (zones pré- et post-PCR).
- Les amplicons ne doivent pas être ramenés dans la zone de préparation de la PCR.
- Utiliser les dispositifs et autres matériels uniquement à leur place respective et ne pas les échanger.

5.2 Isolement de l'ADN

Préparer l'ADN échantillon par la méthode standard utilisée par le laboratoire pour l'isolement des ADN destinés à la PCR (il est préférable de ne pas utiliser la technique du relargage au sel).

<u>Méthodes d'isolation d'ADN validées :</u>

- Colonnes de marque Quiagen

<u>Méthodes utilisées avec succès en pratique :</u>

- Quick-Gene 610L, 800, 810 & Mini-80 (marque Kurabo)
- EZ-1 / GenoM6 (marque Quiagen)
- Maxwell 16 (marque Promega)
- QuatroProbe (marque BeeRobotics)

La présence d'héparine peut inhiber la PCR. De ce fait, il est recommandé d'utiliser du sang recueilli sur EDTA ou sur citrate pour le typage.

L'ADN de l'échantillon doit avoir une concentration comprise entre 15 et 30 ng/µL et un indice de pureté (rapport DO_{260}/DO_{280}) compris entre 1,5 et 2,0. Des valeurs plus élevées sont le signe d'une présence d'ARN, des valeurs plus faibles, celui d'une contamination par des protéines.

Concernant le rapport DO_{260}/DO_{230} celui-ci doit être > 1,8 car des valeurs plus faibles sont observées en présence de carbohydrates, des sels ou des solvants organiques.

5.3 Amplification de l'ADN

Pour chaque typage multi-locus sortir du réfrigérateur une barrette PCR PCR Primers contenant déjà les amorces d'amplification.

Effectuer un mélange initial pour chaque échantillon, avec les composants suivants :

80 µL Tampon PCR
40 µL $MgCl_2$
40 µL Échantillon d'ADN (**15-30** ng/µL)

Distribuer **20 µL** du mélange initial dans **chaque cupule** contenant déjà les amorces et remettre en suspension les amorces à l'aide du mélange initiale ajouté.

Remarque : il est important que la concentration en ADN soit comprise entre **15** et **30** ng/µL. Des concentrations plus élevées peuvent conduire à des réactions de sondes faussement positives et des concentrations plus faibles peuvent entraîner des échecs d'amplification.

Pour effectuer un **Contrôle négatif** veuillez utiliser le puits n° 8 et préparer pour cela une réaction PCR contenat de l'eau distillée à la place de l'ADN :

10 µL Tampon PCR
5 µL $MgCl_2$
5 µL H_20

Sceller les barrettes PCR avec les bouchons, les centrifuger rapidement, les placer dans le thermocycleur et lancer l'amplification dans les conditions suivantes :

Étape de programme	Durée	Température	Nb de cycles
Première dénaturation	2 mn	96 °C	1 cycle
Dénaturation	15 s	96 °C	10 cycles
Hybridation + extension	60 s	65 °C	
Dénaturation	10 s	96 °C	20 cycles
Hybridation	50 s	61 °C	
Extension	30 s	72 °C	
Maintien	∞	22 °C	

<u>**N.B. :**</u> ces conditions sont identiques pour tous les thermocycleurs. Toutefois, le temps total nécessaire pour cette étape varie selon la « vitesse de rampe » de chaque modèle de thermocycleur.

Les modèles suivants de thermocycleurs ont été validés avec les tests HISTO SPOT SSO :

- <u>Applied Biosystems :</u> PE 9600, PE 9700 (utiliser la vitesse de rampe du PE 9600) & Veriti™
- <u>Biorad :</u> PTC 100 / PTC 200 & MyCycler
- <u>Eppendorf :</u> Mastercycler EP Gradient S

<u>**N.B.:**</u> en cas d'utilisation d'autres thermocycleurs, une validation doit être effectuée par l'utilisateur.

De manière générale, il est recommandé d'utiliser une vitesse de rampe de 1 à 2 °C/seconde.

Une fois l'étape d'amplification terminée, les échantillons peuvent être analysés immédiatement ou conservés entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de 5 jours (hermétiquement scellés).

Analyse des amplicons sur gel : il n'est pas nécessaire de réaliser un gel pour contrôler l'amplification. Cela est d'autant plus justifié que l'amplification peut être correcte même si le gel ne présentait qu'une bande très faiblement visible. - Si cependant il est prévu de réaliser un gel, ne veuillez pas utiliser plus que 2 à 3 µL d'amplicon. Les tailles des différents amplicons sont indiquées sur le CD d'information fourni dans chaque trousse de tests sous « Hit Table » (fichier .xls), puis deuxième onglet intitulé « Notes ».

5.4 Hybridation & Détection automatisées par le processeur MR.SPOT®

5.4.1 Démarrage de l'instrument MR.SPOT®

Mettre sous tension le processeur MR.SPOT®, l'écran de démarrage s'affiche. Suivez les instructions à l'écran pour préparer le lancement de votre série. Plus de détails sont décrits dans le Manuel utilisateur du processeur MR.SPOT®.

Remarque : éviter l'exposition au soleil du processeur MR.SPOT® et de ces réactifs associés !

5.4.2 Préparation des réactifs nécessaires

Sortir la trousse HISTO SPOT® *Reagent Kit* et les cupules réactionnelles HISTO SPOT® Combistrip du réfrigérateur et les laisser se réchauffer à température ambiante.

Aller chercher les amplicons (si thermocyclage complet) et les placer soigneusement sur le bloc échantillon (gauche). Terminer ce transfert on s'assurant du bon positionnement et de la bonne orientation de la barrette PCR (suivez l'aide en ligne sur l'écran tactile) avant de l'ouvrir soigneusement.

Placer ensuite le support spécial avec les cupules réactionnelles Combistrip dans le bloc réactionnel (droite). S'assurer du bon positionnement et de la bonne orientation du support (suivez l'aide en ligne sur l'écran tactile).

N.B.: s'assurer de l'absence de saleté ou de particules de plastique sur le bloc réactionnel, car celles-ci peuvent perturber le transfert de chaleur pendant l'hybridation.

Pour deux composants du *Reagent kit* on peut souvent observer des **cristaux** de sel. Dans ce cas, rechauffer le Tampon d'hybridation (orange) et la Solution de lavage drastique (bleu) à environ 30 °C pour dissoudre ces cristaux.

N.B.: réchauffer **tout le contenu du flacon** et pas seulement un aliquote !

Le Conjugué doit être dilué au 1:**1666**^e^ dans du Tampon de blocage. La dilution du conjugué doit toujours être préparée fraîchement pour chaque série de test.

N.B. : le **Conjugué doit être mélangé au vortex et centrifugé** chaque fois avant l'étape de dilution !

Les volumes nécessaires de tous réactifs communs varient selon le nombre de typages à réaliser. Le processeur MR.SPOT® calcule et affiche les volumes nécessaires (volumes morts compris) pour chaque liste de travail (suivez l'aide en ligne sur l'écran tactile). Verser alors les volumes nécessaires de réactifs dans les réservoirs marqués en conséquence (suivez l'aide en ligne sur l'écran tactile).

5.4.3 Transfert des images sur un PC pour l'interprétation

Transférer les données au logiciel HISTO MATCH par l'intermédiaire du réseau (à défaut utilisez une clé USB) tel qu'indiqué dans le Manuel utilisateur du logiciel HISTO MATCH.

5.4.4 Interprétation des images à l'aide du logiciel HISTO MATCH

Ouvrir le logiciel HISTO MATCH et sélectionner la liste de travail en question puis interpréter, une fois que les images ont été traitées et pré-interprétées par le logiciel, et valider les résultats. Pour le détail veuillez suivre les instructions du Manuel utilisateur du logiciel HISTO MATCH.

Les images doivent ressembler à l'exemple présenté à la figure 2 ci-dessous.

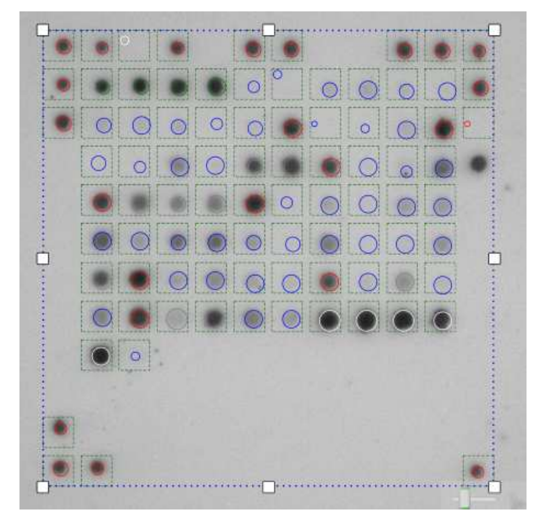


Figure 2 : Image d'un résultat pour le HLA A

N.B.: la couleur des cercles autour des points obtenus, qui sont plus ou moins grands et plus ou moins denses, indique la fonction de chaque point
(l'illustration schématique donnée par la figure 3 ci-dessous donne de plus amples détails)

La figure 3 présenté à la suite (cf. page 9) donne une illustration schématique de l'image type obtenue et des fonctions des différentes sondes.

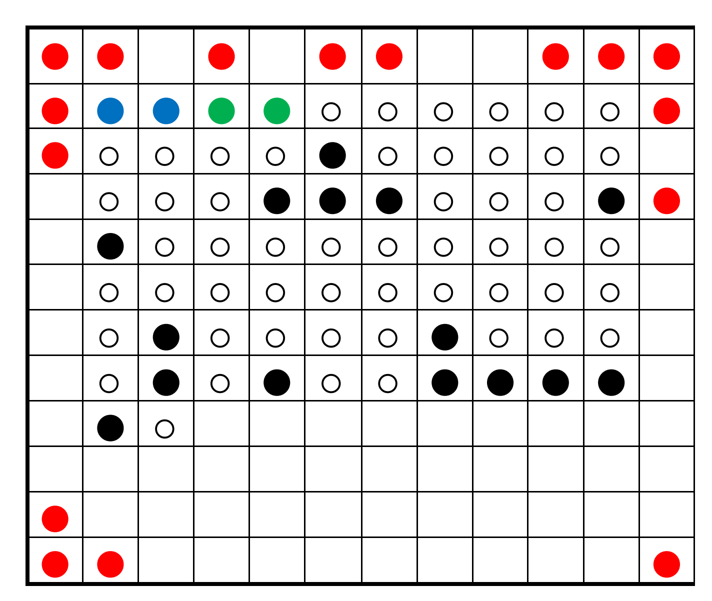


Figure 3 : Illustration des différentes fonctions des points

● = *sondes de position*, qui réagissent avec les amorces d'amplification. Elles indiquent que les amorces ont bien été présentes et que lors du travail automatique les réactifs communs ont été distribués par l'instrument

Par ailleurs, elles permettent au logiciel de positionner l'image avant l'interprétation

Tout schéma correspond à un lot de vrac

● + ● = *contrôles d'amplification* pour les exons 2 & 3, traités en double. Ces sondes sont universelles pour les allèles du locus ciblé et montre ainsi la réussite de la PCR

Leur fonction principale est de fixer le seuil pour les sondes spécifiques d'allèle

● = *sonde spécifique* d'allèle, signal positif

O = *sonde spécifique* d'allèle, signal négatif

6. PRECAUTIONS ET TRAITEMENT DES DECHETS

Le système HISTO SPOT® est conçu pour une utilisation de diagnostic *in vitro* et doit être manipulé par du personnel qualifié et formé. Toute utilisation doit respecter les bonnes pratiques de laboratoire.

Les produits biologiques utilisés pour l'extraction de l'ADN, par exemple le sang ou un tissu humain, doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses. Il est donc recommandé de respecter les précautions de sécurité adaptées pour manipuler les produits biologiques (ne pas pipeter à la bouche, utiliser des gants jetables pour manipuler les produits biologiques et réaliser le test, se désinfecter les mains une fois la manipulation terminée).

Les déchets biologiques doivent être inactivés avant leur élimination (ex.: dans un autoclave). Les produits jetables doivent être autoclavés ou incinérés après usage.
Un renversement de produits potentiellement infectieux doit être ramassé immédiatement avec du papier absorbant et les zones contaminées doivent être nettoyées avec un désinfectant standard adapté ou avec de l'alcool à 70 %.
Les matériels utilisés pour nettoyer les renversements, y compris les gants, doivent être inactivés avant leur élimination (ex.: dans un autoclave).

Le tampon de blocage, le tampon d'hybridation, le tampon de lavage drastique et le tampon de lavage TBS contiennent du ProClin® 150, et la solution de chlorure de magnésium contient du ProClin® 300. La concentration en conservateur dans les réactifs est de seulement 0,001 %. Éviter toutefois le contact avec la peau et les membranes muqueuses.

Le tampon PCR et le conjugué contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Les réactifs contiennent une concentration < 0,1 % d'azide de sodium, qui n'est pas considérée comme dangereuse. Éviter toutefois le contact avec la peau et les membranes muqueuses. L'azide de sodium peut réagir avec les tuyauteries de plomb et de cuivre et former des azides métalliques explosifs. Au moment d'éliminer les

solutions contenant de l'azide de sodium dans les éviers de laboratoire, rincer les tuyauteries avec de grandes quantités d'eau pour éviter la formation d'azide.

Toute la manipulation avec les réactifs doit être réalisée en respectant les précautions adaptées. Porter une protection oculaire, une blouse de laboratoire et des gants jetables pour manipuler les réactifs. Éviter le contact de ces produits avec la peau, les yeux et les membranes muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement avec une grande quantité d'eau. Sinon, une brûlure pourrait se produire.

Si des réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant de les éponger. Ne pas exposer le substrat aux métaux ni aux agents oxydants.

L'élimination de tous les échantillons, des réactifs non utilisés et des déchets doit respecter les réglementations nationales, fédérales et locales.

Éviter la contamination microbienne des réactifs au moment de prélever un aliquot dans les flacons. L'utilisation de pipettes et de pointes de pipettes stériles jetables est recommandée. Ne pas utiliser de réactifs présentant une turbidité ou une contamination microbienne apparente.

Les **Fiches de Données de Sécurité** peuvent être téléchargées à l'adresse **www.bag-healthcare.com**

7. CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES

7.1 Évaluation des performances

Les trousses HISTO SPOT® SSO ont été évaluées lors d'une étude portant sur plus de 180 échantillons pour chaque locus. Les résultats ont été comparés à ceux d'autres méthodes de typage (p.ex.: SSP, séquençage). Aucune discordance n'a été observée entre les méthodes de typage. Par-dessus une étude mettant en œuvre des réactifs sous sa forme combinatoire (combi-tests, ici les amorces sont toutes présentées séchées dans une barrette PCR prêt à l'emploi) a été menée avec 30 échantillons supplémentaires. Dans cette étude non plus aucune discordance par rapport aux résultats de typage connus n'a pu être observée.

Pour chaque lot fabriqué, la spécificité de chaque sonde est vérifiée à l'aide d'ADN d'échantillons de référence.

7.2 Amplifications par réaction PCR

Les allèles amplifiés par chaque trousse HISTO SPOT® SSO, la version de la nomenclature HLA et les exons amplifiés sont indiqués avec les informations spécifiques du lot respectif. Ces informations sont rassemblées sur le CD fourni avec chaque trousse.

7.3 Résolution de la technique

Le système de typage HISTO SPOT® SSO est conçu pour fournir au minimum des résultats sans ambiguïté au niveau des groupes d'allèles, c'est-à-dire sur une résolution sur 2 digits.

Des associations d'allèles différentes, qui présentent le même schéma de sondes positives et qui recoupent des groupes d'allèle, sont considérées comme ambiguës.

8. LIMITES DE LA MÉTHODE

En raison de la grande sensibilité de l'analyse par PCR aux variations de concentration et de qualité de l'ADN, seuls des échantillons d'ADN avec une concentration comprise entre 15 et 30 ng/µL et un indice de pureté (rapport DO_{260}/DO_{280}) compris entre 1,5 et 2,0 doivent être utilisés.

Un soin particulier doit être pris pour éviter la contamination des réactifs de la trousse et des autres produits et équipements de laboratoire avec des amplicons ou de l'ADN. Il est fortement recommandé de réaliser régulièrement des tests de contamination (ex.: BAG Wipetest, RÉF 7091) et d'utiliser des contrôles négatifs dans chaque série d'analyse.

L'hybridation est un procédé très sensible à la température. De ce fait, les trousses HISTO SPOT® SSO ne doivent être utilisées qu'en association avec le processeur MR.SPOT® pour assurer des températures et temps d'incubation valides.

Tous les instruments (p.ex.: pipettes, thermocycleurs, blocs chauffants, instrument MR.SPOT®) doivent être étalonnés conformément aux instructions des fabricants. L'exactitude et l'uniformité de température du thermocycleur peuvent être testées avec la trousse BAG CyclerCheck, RÉF 7104.

9. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Le Contrôle qualité des nouveaux lots de trousses HISTO SPOT® SSO peut être réalisé à l'aide d'un « panel maison » d'échantillons d'ADN, typés pour les critères HLA dont la trousse est spécifique.
Le système HISTO SPOT® SSO offre sur chaque une des biopuces (cupule réactionnelle) des **Contrôles positifs**, ceci afin de vérifier la réussite des réactions d'amplification et de l'hybridation.

Il est recommandé d'utiliser des **Contrôles négatifs** lors de chaque série de typage pour détecter d'éventuelles contaminations. Préparez pour cela un mixe initial sans ADN et l'utiliser le lors des réactions d'amplification et d'hybridation comme Contrôle négatif.

10. GESTION DES INCIDENTS

Symptôme	Problème(s) possible(s)	Solution(s) éventuelle(s)
- Dysfonctionnement de l'instrument	- Nombreux	- Consulter le manuel utilisateur du système MR.SPOT®
- Message d'erreur au transfert de données	- Erreur de transfert des données	- Transférer les données manuellement avec une clé USB
- Aucun résultat	- Erreur d'adressage	- Réaliser l'adressage manuellement
- Seuls les spots de contrôle sont positifs	- ADN non ajouté à la PCR ou erreur d'amplification	- Recommencer toute l'analyse et vérifier le produit PCR sur gel
- Sondes faussement positives	- Utilisation d'une quantité d'ADN trop importante ou conjugué trop concentré (non centrifugé)	- Vérifier la concentration en ADN, centrifuger le conjugué avant son utilisation
- Absence d'amplification de l'exon	- Concentration en ADN trop élevée ou ADN dégradé	- Vérifier la concentration en ADN, tester l'ADN sur gel
- Aucun résultat ou résultat non concluant en raison de signaux faibles	- Erreur de dilution du conjugué ou amplification faible - Dysfonctionnement de l'instrument	- Recommencer l'analyse - Vérifier la température d'hybridation sur l'instrument

11. MARQUES COMMERCIALES UTILISÉES

- ProClin® est une marque commerciale de l'entreprise Rohm & Haas.
- BCIP® est une marque commerciale de Sigma Aldrich Co.
- Veriti™ est une marque commerciale d'Applied Biosystems.

12. EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISÉS

IVD	Pour usage de diagnostic *in vitro*
	Température de conservation
LOT	N° de lot
	Utiliser avant
REF	Code produit
	Consulter le Mode d'emploi
HLA TYPING	Destiné au : Typage HLA
Combistrip	Cupules réactionnelles contenant des sondes immobilisées pour le typage des loci HLA-A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQ, DPB1
PCR Primers	Barrettes PCR contenant des amorces séchées pour l'amplification des loci HLA-A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQ, DPB1
PCR Caps	Couvercles pour barrettes PCR
PCR Buffer	Tampon PCR
MgCl2	Solution de Chlorure de magnésium

N.B. : pour les ***modes d'emploi*** en d'**autres langues**, veuillez utiliser ce lien :
http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/